

1A20 Rec'd PCT/PTO 03 JUL 2006

明 細 書

人工生理的塩類溶液およびその製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、人工生理的塩類溶液およびその製造方法に関する。

背景技術

[0002] 近年、ドライアイやコンタクトレンズ使用による目の乾き、異物感、目の疲れ、目のかゆみ、まばたきの増加、充血などの症状を呈する人が増加の一途をたどっている。ドライアイとは、目の表面をカバーし外界からの病原体を駆除したり、隔膜に栄養を運んだりする役割を有する涙の量が様々な原因によって減少し、目の表面をカバーする機能が阻害されてしまう状態である。これにより、上記の目の乾き、異物感、目の疲れ、目のかゆみ、まばたきの増加、充血などの症状が現れる。ドライアイの原因としては、加齢による涙腺分泌能低下、結膜炎、ビタミンA欠乏症、シェーグレン症候群、Steven-Johnson症候群、リュウマチ、糖尿病、薬剤などが挙げられ、それにより分泌不全型ドライアイが引き起こされる。また近年では、コンタクトレンズ装用による涙液の蒸発亢進、VDT(Visual Display Terminals)作業中に見られる瞬きの回数の減少などにより、蒸発亢進型のドライアイが引き起こされる。

[0003] 従来から、ドライアイの治療としては、涙液の分泌量と蒸発量のバランスを保つことを基本概念として、部屋の加湿や規則的な瞬きなどの生活指導、人工涙液の頻回点眼、保護眼鏡による涙液蒸発量の抑制、涙点の閉鎖といった方法が用いられていた。近年では、ドライアイ患者の涙液層では、酸化反応や炎症反応が認められることが既に明らかとなってきた(たとえば、Albert J. Augustinら、“Oxidative reactions in the tear fluid of patients suffering from dry eyes”、Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology、Springer、第233巻、第11号、1995年、p. 694-698(非特許文献1)を参照)。このため、ドライアイの原因となる或いは結果となる炎症変化に注目されるようになっており、ステロイド剤を点眼することによりドライアイの症状を緩和する試みがなされている(たとえば、Avni M. Avundukら、“The Comparison of Efficacies of Topical Cor

ticosteroids and Nonsteroidal Anti-inflammatory Drops on Dry Eye Patients: A Clinical and Immunocytochemical Study”, American Journal of Ophthalmology, Elsevier Science, 第136巻、第4号、2003年10月、p. 593-602(非特許文献2)を参照)。

- [0004] しかしながら、涙液の分泌量と蒸発量のバランスを保つことを基本概念とした治療法では、生活指導などを行なったとしても、忙しく働かざるを得ない現代社会において十分に遂行されることが困難であり、実質的効果は期待できない。また、ステロイド剤の点眼に関しては、その効き目は確かであると予想されるが、度重なる使用による効果の低下や中止時のリバウンドなどの重篤な副作用が十分に予想される。したがって、副作用などが発現することなく、酸化反応や炎症反応を抑制できる、目の洗浄あるいは点眼に適用可能な新規な組成物の開発が望まれている。
- [0005] また、花粉症などのアレルギー症状の軽減を目的として、鼻腔の洗浄に用いられる洗浄液も従来より知られている。鼻腔の洗浄液としては、従来、生理的食塩水などが用いられているため、酸化反応や炎症反応を抑制する能力はない。このため、上述した目の洗浄液の場合と同様に、酸化反応や炎症反応を十分に抑制できる鼻腔の洗浄液の開発が望まれているのが現状である。
- [0006] 近年では、たとえば総合アミノ酸輸液、高カロリー輸液用糖・電解質・アミノ酸液、電解質輸液、高カロリー輸液用糖・電解質液、腹腔透析液、人工腎臓用透析液などの人工輸液が、医療の現場で頻繁に用いられている。このような人工輸液は、術後の回復や脱水の補給、生存維持などの目的で使用されるものであるが、このような状態のときは体内にダメージがあり、活性酸素による酸化ダメージが考えられる。また、人工輸液のほか、出産の現場で胎児の生命を維持するために用いられる人工羊水や、心臓手術の際に用いられる心筋保護液などの保護液についても、活性酸素による同様の酸化ダメージの問題が考えられる。したがって人工輸液、人工羊水、保護液においても、人体内での酸化反応や炎症反応を抑制できるものであることが望まれるが、酸化ダメージに対する防御物質が組込まれた人工輸液、人工羊水、保護液は未だ開発されていない。
- [0007] また、培養する細胞や組織に害を及ぼさないよう人体の体液に近い組成で調整さ

れる細胞・組織培養液においても、酸化ダメージを十分に防ぎ得る防御物質を含有するものは未だないというのが現状である。細胞・組織培養液を用いて培養される細胞や組織は、体内における細胞・組織とは異なり人為的に扱い易い状態としているため、体内の細胞・組織と比較して酸化ストレスを受け易く、このような酸化ダメージを抑制し得る新規な細胞・組織培養液の開発は、特に有用であるといえる。

非特許文献1: Albert J. Augustinら、“Oxidative reactions in the tear fluid of patients suffering from dry eyes”, Graefe’s Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology, Springer, 第233巻、第11号、1995年、p. 694–698

非特許文献2: Avni M. Avundukら、“The Comparison of Efficacies of Topical Corticosteroids and Nonsteroidal Anti-inflammatory Drops on Dry Eye Patients: A Clinical and Immunocytochemical Study”, American Journal of Ophthalmology, Elsevier Science, 第136巻、第4号、2003年10月、p. 593–602

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0008] 本発明は、上記課題を解決するためになされたものであって、その目的とするところは、活性酸素消去能および抗炎症作用を有し、器官洗浄液（目の洗浄液、鼻腔の洗浄液など）、人工輸液、人工羊水、保護液、細胞・組織培養液など、多様な用途に適用することができる新規な人工生理的塩類溶液、およびその製造方法を提供することである。

課題を解決するための手段

- [0009] 本発明の人工生理的塩類溶液は、活性水素反応値が0.01–1、pHが4.0–7.9（好ましくは、6.0–7.9）、浸透圧が260–2560mOsm/L（好ましくは、260–320mOsm/L）であることを特徴とする。
- [0010] ここにおいて本発明の人工生理的塩類溶液は、ナトリウムイオン、カリウムイオンおよび塩化物イオンを含むものであることが好ましい。
- [0011] 本発明の人工生理的塩類溶液は、ナトリウムイオンを200mEq/L以下含むことが

好ましい。

[0012] また本発明の人工生理的塩類溶液は、カリウムイオンを100mEq/L以下含むことが好ましい。

[0013] 本発明の人工生理的塩類溶液は、塩化物イオンを200mEq/L以下含むことが好ましい。

[0014] また、本発明の人工生理的塩類溶液は、電解還元水にイオンバランスの調整を施したものであることが好ましい。

[0015] さらに本発明の人工生理的塩類溶液は、酸化還元電位が -800 ～ $+200$ mVであることが好ましい。

[0016] 本発明の人工生理的塩類溶液は、以下の(a)～(c)の用途に好適に用いることができるものである。

(a) 器官洗浄液

(b) 人工輸液、人工羊水または保護液

(c) 細胞・組織培養液

[0017] 本発明はまた、電解還元水を、活性酸素反応値が 0.01 ～ 1 、pHが 4.0 ～ 7.9 （好ましくは、 6.0 ～ 7.9 ）、浸透圧が 260 ～ 2560 mOsm/L（好ましくは、 260 ～ 320 mOsm/L）となるように調整することを特徴とする人工生理的塩類溶液の製造方法も提供する。

[0018] 本発明の人工生理的塩類溶液の製造方法において、塩化ナトリウムおよび／または塩化カリウムを添加することによって、電解還元水のイオンバランスを調整する工程をさらに含むことが好ましい。

発明の効果

[0019] 本発明の人工生理的塩類溶液は、活性酸素消去能、炎症性細胞である多形核白血球、特に好中球の走化活性、遊走活性を抑制する作用を示し、さらには適用する器官、組織、細胞に悪影響を及ぼすことがないので、人工的に作製した生理的塩類溶液として多様な用途に好適に適用することができる。

[0020] たとえば、本発明の人工生理的塩類溶液は、ステロイド剤以外の従来の目の洗浄液と比較して強い活性酸素消去能、抗炎症作用を有するため、目の洗浄液として適

用した場合には、従来よりも少ない洗浄回数、点眼回数で十分な効果を発現し得る。したがって忙しく働かざるを得ない現代社会においても、治療の実質的効果を期待できる。また、本発明の人工生理的塩類溶液は、従来のステロイド剤を用いた場合とは異なり不所望な副作用が起こることなく、目の炎症を抑制でき、活性酸素やそれを引き起こす物質による目の組織のダメージを受けにくくすることができ、それによって目の乾き・異物感、目の疲れ、目のかゆみ、瞬きの増加、充血などの症状を緩和するという効果を発揮することができる。

[0021] また、本発明の人工生理的塩類溶液を鼻腔の洗浄液として適用した場合には、鼻腔内の埃や雑菌、花粉などを取り除き、鼻腔内の洗浄を好適に行なうことができ、また、人工生理的塩類溶液が有する抗酸化作用、抗炎症作用によって、不所望な副作用が起こることなく花粉症などのアレルギー症状を抑制できるという効果を発揮することができる。

[0022] また本発明の人工生理的塩類溶液を人工輸液、人工羊水または保護液として適用した場合には、細胞や組織、器官、胎児が酸化ダメージを受けにくくなり、結果として回復が早くなるという効果を発揮することができる。

[0023] さらに、本発明の人工生理的塩類溶液を細胞・組織培養液として適用した場合には、細胞や組織が酸化ダメージを受けにくくなり、より体内に近い環境での培養細胞、培養組織を用いた実験系の実現が可能となる。また、特に、初代培養細胞（セルライン化する前の培養細胞）に本発明の人工生理的塩類溶液を細胞・組織培養液として適用した場合には、酸化ダメージの抑制により初代培養細胞の寿命が延びる、という顕著な効果を発揮する。

図面の簡単な説明

[0024] [図1]本発明の人工生理的塩類溶液による好中球の遊走・走化能の抑制活性を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

[0025] 本発明の人工生理的塩類溶液は、それぞれ特定範囲の活性水素反応値、pH、浸透圧を兼ね備えることを特徴とする。本発明の人工生理的塩類溶液によれば、適用する器官、組織、細胞に悪影響を及ぼすことなく、後述するような活性酸素消去能、

炎症性細胞である多形核白血球、特に好中球の走化活性、遊走活性を抑制して抗炎症効果を発揮し得る。ここで、「人工生理的塩類溶液」とは、人体中の体液に近似した組成を有する人工的に作製された生理的塩類溶液を指す。なお、「体液に近似した組成」とは、人工生理的塩類溶液を用途に応じ器官、組織または細胞に適用した際に、器官、組織または細胞に害を及ぼさない程度に当該器官、組織または細胞における体液の組成に近い組成を指す。本発明の人工生理的塩類溶液は、具体的には、器官洗浄液（たとえば目の洗浄液（点眼剤を含む）や鼻腔の洗浄液）、人工輸液、人工羊水、保護液（たとえば心筋保護液）、細胞・組織培養液など、広範にわたる応用が期待できる。

[0026] 本発明の人工生理的塩類溶液は、活性水素反応値（水素ラジカル反応値）が0.01～1の範囲内にあるものである。活性水素反応値が0.01未満または1を越えると、活性酸素消去能、抗炎症効果が低下してしまう、あるいは消滅してしまうため、本発明の目的を達成することができない。本発明の人工生理的塩類溶液における活性水素反応値は、上記範囲内にあるならば特に制限されないが、0.1～1であるのが好ましく、0.5～1であるのがより好ましい。

[0027] なお、本発明の人工生理的塩類溶液における活性水素反応値は、特開2002-350420号公報にて、本出願人が提案した方法（以下、「DBNBS法」と呼称する。）に準じて測定した値を指す。活性水素反応値の測定は、具体的には、以下のように行なう。

(1) 517nm近傍に吸収を有する1, 1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル(DPPH)の溶液に、白金黒存在下で一定の速度で水素ガスを吹き込み、517nm近傍の吸光度の減衰と水素ガスの吹き込み時間との相関のグラフを求める(検量線Aの作成)。

(2) 100 μ M以下のシステインとDPPHを反応させ、DPPHの517nm近傍の吸光の減衰とシステイン濃度との相関のグラフを求める(検量線Bの作成)。

(3) 450nm近傍に吸収を有する3, 5-ジブロモ-4-ニトロベンゼンスルホン酸のナトリウム塩(DBNBS)の溶液に白金黒存在下で一定の速度で水素ガスを吹き込み、450nm近傍の吸光度と活性水素濃度との相関のグラフを求める(検量線Cの作成)。

(4) 試料(人工生理的塩類溶液)にDBNBSを添加し、60℃で1時間加熱後の450nm近傍の吸光度を測定して、得られた測定値を活性水素反応値(水素ラジカル反応値)とする。

[0028] 本発明の人工生理的塩類溶液は、pHが4.0ー7.9(好ましくは6.0ー7.9)の範囲内にあるものである。pHが4.0未満または7.9を越えると、適用する器官、組織または細胞に不所望な障害、機能低下が発生する虞があり、本発明の目的を達成することができない。本発明の人工生理的塩類溶液におけるpHは、上記範囲内にあるならば特に制限されないが、たとえば、本発明の人工生理的塩類溶液を器官洗浄液の用途に適用する場合には、6.0ー7.7であるのが好ましい(中でも、本発明の人工生理的塩類溶液を目の洗浄に用いる場合には、pHが7.3ー7.6の範囲であるのが好適であり、鼻腔の洗浄に用いる場合には、pHが6.0ー7.4の範囲であるのが好適である。)。また本発明の人工生理的塩類溶液を人工輸液、人工羊水または保護液の用途に適用する場合には、4.0ー7.6であるのが好ましく、7.1ー7.6であるのがより好ましく、7.3ー7.5であるのが特に好ましい。また、本発明の人工生理的塩類溶液を細胞・組織培養液の用途に適用する場合には、6.9ー7.5であるのが好ましく、7.1ー7.3であるのがより好ましい。

[0029] なお、本発明の人工生理的塩類溶液におけるpHは、pHメータ(φ260、ベックマン社製)を用い、pH電極を人工生理的塩類溶液に浸漬して表示を読み取ることで測定された値を指す。

[0030] 本発明の人工生理的塩類溶液は、浸透圧が260ー2560mOsm/L(好ましくは260ー320mOsm/L)の範囲内にあるものである。浸透圧が260mOsm/L未満または2560mOsm/Lを越えると、適用する器官、組織または細胞に不所望な障害、機能低下が発生する虞があり、本発明の目的を達成することができない。本発明の人工生理的塩類溶液における浸透圧は、上記範囲内にあるならば特に制限されないが、たとえば、本発明の人工生理的塩類溶液を器官洗浄液の用途に適用する場合には、270ー315mOsm/Lであるのが好ましく、280ー305mOsm/Lであるのがより好ましい。また本発明の人工生理的塩類溶液を人工輸液、人工羊水または保護液の用途に適用する場合には、270ー2560mOsm/Lであるのが好ましく、270

ー310mOsm/Lであるのがより好ましく、280ー300mOsm/Lであるのが特に好ましい。また、本発明の人工生理的塩類溶液を細胞・組織培養液の用途に適用する場合には、260ー310mOsm/Lであるのが好ましく、265ー280mOsm/Lであるのがより好ましい。

[0031] なお、本発明の人工生理的塩類溶液における浸透圧は、浸透圧計(オスモメータ、ROEBLING社製)を用い、氷点降下法の原理に基づいて測定された値を指す。

[0032] 上述したように活性酸素反応値、pHおよび浸透圧がそれぞれ特定範囲内である本発明の人工生理的塩類溶液によれば、活性酸素消去能、炎症性細胞である多形核白血球、特に好中球の走化活性、遊走活性を抑制する作用を示し、さらには適用する器官、組織、細胞に悪影響を及ぼすことがないので、人工的に作製した生理的塩類溶液として多様な用途に好適に適用することができる。

[0033] ここで、本発明の人工生理的塩類溶液が有する活性酸素消去能については、たとえば、フェントン反応法によって確認することができる。フェントン反応法は、活性酸素のうち $\cdot\text{OH}$ を測定する方法であり、過酸化水素から鉄を触媒として $\cdot\text{OH}$ を発生させ、 $\cdot\text{OH}$ により発光試薬であるルミノールを励起させ、そのときに生じる発光を利用して活性酸素の減少を見る方法である。具体的な操作方法是、高感度化学発光測定器(CLD-110、東北電子産業株式会社製)を用い、セル中に0.1Mのトリス塩酸緩衝液(pH7.8)、 $2.5\mu\text{M}$ のルミノール、 $5\mu\text{M}$ のDTPA(diethylenetriamine-N, N, N', N'', N'''-pentaacetic acid)、 $5\mu\text{M}$ の FeSO_4 、 $50\mu\text{M}$ の過酸化水素を週濃度になるように加えた後、試料(人工生理的塩類溶液)を添加し、全量が2mLとなるように調整した上で発光強度の変化を測定することで確認することができる。

[0034] また、本発明の人工生理的塩類溶液が有する活性酸素消去能については、上記フェントン反応法以外にも、過酸化水素法やHX-XOD法によって測定することも可能である。過酸化水素法は、活性酸素のうち H_2O_2 を測定する方法であり、上述したフェントン反応法の反応液からDTPAの FeSO_4 混液を除いた反応液を用いて、過酸化水素に由来するルミノール発光を測定する方法である。また、HX-XOD法は、活性酸素のうち $\text{O}_2\cdot$ を測定する方法であり、HX(ヒポキサンチン)を基質とし、XOD(キサ

ンチンオキシダーゼ)により $O_2^{\cdot -}$ を発生させ、 $O_2^{\cdot -}$ が発光試薬であるCLA(和光純薬工業株式会社製)を励起させ、そのときに生じる活性酸素の減少を見る方法である。HX-XOD法は、具体的には、CLD-110のセル中に、 $0.2 \mu M$ のリン酸緩衝液(pH7.8)、 $1 \mu M$ のCLA、 $5U/mL$ のXOD、 $10 \mu M$ のHXを終濃度となるように加えた後、試験体(人工生理的塩類溶液)を添加し、全量が2mLとなるように調製した上で発光強度の変化を測定することで、活性酸素消去能を確認することができる。

[0035] また、本発明の人工生理的塩類溶液による炎症性細胞の引き寄せ(走化活性、遊走活性)の効果は、ケモタキシスチャンバ法によって確認することができる。具体的には、まず、本発明の人工生理的塩類溶液に、ヒト血液より分離された好中球を浮遊させ一定時間処理する。その後、IL-8、RANTESなどのケモカインの溶液をチャンバのウェルに入れ、その上にポリカーボネート製の膜(ポリビニルピロリドンフリー)(好中球よりわずかに小さな穴が規則的に設けられている)を載置し、その上に上記好中球の浮遊液を添加し、一定時間遊走・走化させ、膜の穴を通してウェルの中にまで遊走・走化した好中球を、Diff-Quikなどの染色液で染色しカウントすることで、評価することができる。

[0036] 本発明の人工生理的塩類溶液は、ナトリウムイオン(Na^+)、カリウムイオン(K^+)および塩化物イオン(Cl^-)の少なくともいずれかを含むことが好ましい。本発明の人工生理的塩類溶液が、ナトリウムイオン(Na^+)、カリウムイオン(K^+)および塩化物イオン(Cl^-)の少なくともいずれかを含有しない場合には、人工生理的塩類溶液を適用した器官、組織、細胞において細胞増殖の停止がみられ、器官、組織、細胞の機能が低下または停止してしまう虞があるためである。本発明の好ましい態様の人工生理的塩類溶液においては、ナトリウムイオン、カリウムイオンおよび塩化物イオンの少なくともいずれかを含むことで、人工生理的塩類溶液を適用する器官、組織または細胞の機能を維持できるという効果を発揮することができる。

[0037] 本発明の人工生理的塩類溶液は、ナトリウムイオンを含む場合、 $200mEq/L$ 以下含むことが好ましい。ナトリウムイオンの含有量が $200mEq/L$ を越えると、適用する器官、組織または細胞に不所望な障害、機能低下が発生する虞があるためである。また、本発明の人工生理的塩類溶液は、適用する器官、組織または細胞の機能低

下を防ぐ観点からは、ナトリウムイオンを30mEq/L以上含むことが好ましい。

[0038] 本発明の人工生理的塩類溶液におけるナトリウムイオンの含量は、上記のように200mEq/L以下であることが好ましいが、たとえば、本発明の人工生理的塩類溶液を器官洗浄液の用途に適用する場合には、125ー165mEq/Lであるのが好ましく、135ー155mEq/Lであるのがより好ましい。また本発明の人工生理的塩類溶液を人工輸液、人工羊水または保護液の用途に適用する場合には、135ー170mEq/Lであるのが好ましく、145ー160mEq/Lであるのがより好ましい。また、本発明の人工生理的塩類溶液を細胞・組織培養液の用途に適用する場合には、115ー155mEq/Lであるのが好ましく、125ー145mEq/Lであるのがより好ましい。

[0039] 本発明の人工生理的塩類溶液は、カリウムイオンを含む場合、100mEq/L以下含むことが好ましい。カリウムイオンの含有量が100mEq/Lを越えると、適用する器官、組織または細胞に不所望な障害、機能低下が発生する虞があるためである。また、本発明の人工生理的塩類溶液は、適用する器官、組織または細胞の機能低下を防ぐ観点からは、カリウムイオンを1mEq/L以上含むことが好ましい。

[0040] 本発明の人工生理的塩類溶液におけるカリウムイオンの含量は、上記のように100mEq/L以下であることが好ましいが、たとえば、本発明の人工生理的塩類溶液を器官洗浄液の用途に適用する場合には、10ー40mEq/Lであるのが好ましく、20ー30mEq/Lであるのがより好ましい。また本発明の人工生理的塩類溶液を人工輸液、人工羊水または保護液の用途に適用する場合には、2ー10mEq/Lであるのが好ましく、3ー7mEq/Lであるのがより好ましい。また、本発明の人工生理的塩類溶液を細胞・組織培養液の用途に適用する場合には、1ー8mEq/Lであるのが好ましく、2ー6mEq/Lであるのがより好ましい。

[0041] 本発明の人工生理的塩類溶液は、塩化物イオンを含む場合、200mEq/L以下含むことが好ましい。塩化物イオンの含有量が200mEq/Lを越えると、適用する器官、組織または細胞に不所望な障害、機能低下が発生する虞があるためである。また、本発明の人工生理的塩類溶液は、適用する器官、組織または細胞の機能低下を防ぐ観点からは、カリウムイオンを1mEq/L以上含むことが好ましい。

[0042] 本発明の人工生理的塩類溶液における塩化物イオンの含量は、上記のように200

mEq/L以下であることが好ましいが、たとえば、本発明の人工生理的塩類溶液を器官洗浄液の用途に適用する場合には、110～150mEq/Lであるのが好ましく、120～140mEq/Lであるのがより好ましい。また本発明の人工生理的塩類溶液を人工輸液、人工羊水または保護液の用途に適用する場合には、90～130mEq/Lであるのが好ましく、100～120mEq/Lであるのがより好ましい。また、本発明の人工生理的塩類溶液を細胞・組織培養液の用途に適用する場合には、80～120mEq/Lであるのが好ましく、90～110mEq/Lであるのがより好ましい。

[0043] なお、本発明の人工生理的塩類溶液における上記ナトリウムイオン、カリウムイオン、塩化物イオンの含量は、ICP-MS (Induced coupling plasma-mass spectrometry; 誘導結合プラズマ質量分析装置) (Agilent 7500、Agilent Technologies社製)を用いて測定された値を指すものとする。

[0044] また、本発明の人工生理的塩類溶液においては、上記ナトリウムイオン、カリウムイオン、塩化物イオン以外の成分を、本発明の効果を損なわない範囲で含有してもよい。かかる成分としては、たとえば、アミノ酸類、グルコース、クエン酸、カルシウムイオン、炭酸水素イオン、リン酸水素イオン、リン酸二水素イオン、ブドウ糖、果糖、キシリトール、酢酸、乳酸、マグネシウムイオンなどが挙げられる。その他にも、たとえば本発明の人工生理的塩類溶液を器官洗浄液の用途に適用する場合には、コンドロイチン硫酸ナトリウム、ヒアルロン酸などが挙げられ、本発明の人工生理的塩類溶液を人工輸液、人工羊水または保護液の用途に適用する場合には、亜鉛、硫酸、タンパク質、糖類、脂質、リン、鉄、ヨード、マンガン、銅、バナジウム、尿中トリプシンインヒビター (UTI) などが挙げられ、また、本発明の人工生理的塩類溶液を細胞・組織培養液の用途に適用する場合には、亜鉛、硫酸、タンパク質、糖類、脂質、リン、鉄、ヨード、マンガン、銅、バナジウム、セレンナイト (亜セレン酸ナトリウム)、エタノールアミン、尿中トリプシンインヒビター (UTI)、血清、血漿、アクチビンなどが挙げられる。

[0045] 本発明の人工生理的塩類溶液は、電解還元水にイオンバランスの調整を施したものであることが好ましい。ここで、「電解還元水」は、隔膜で隔てられた陰極室と陽極室のそれぞれに電解質を溶解した水 (原水) を導入して電気分解することによって陰極室に生成される、反応性の大きい原子状水素である活性水素を豊富に含む水で

ある。電解還元水は、還元性(抗酸化性)を有する活性水素を豊富に含むことによって抗酸化作用を有し、結果、様々な疾病の予防や治療に役立ち、老化の進行を抑制するほか、医療以外の分野でも、食品の保存や半導体の洗浄など、多くの分野で利用が期待されている。このように、上述した本発明の人工生理的塩類溶液を電解還元水を利用して調製することで、電解還元水中の活性物質の性質上、活性酸素を消去してもその活性成分は水に戻るだけで副作用がないという利点がある。電解還元水の製法については、たとえば電解還元水製造装置(TI-8000、日本トリム社製)を用いた方法が知られており、その好適な一方法については、本発明の人工生理的塩類溶液の製造方法の説明において後述する。

- [0046] また「イオンバランスの調整」とは、カリウムイオン：ナトリウムイオン＝1：4～1：8(モル比)となるように、ナトリウムイオンとカリウムイオンとの含量を調整することを指す。イオンバランスがカリウムイオン：ナトリウムイオン＝1：4未満である、あるいは、カリウムイオン：ナトリウムイオン＝1：8を越えると、適用する器官、組織または細胞の機能が低下してしまう傾向にあるためである。イオンバランスは、上記中でも、カリウムイオン：ナトリウムイオン＝1：5～1：7となるように調整されるのがより好ましく、カリウムイオン：ナトリウムイオン＝1：6となるように調整されるのが最も好ましい。
- [0047] なお、人工生理的塩類溶液がイオンバランスを施されているか否かは、ICP-MS(Agilent 7500、Agilent Technologies社製)を用いて、人工生理的塩類溶液中に含有されるカリウムイオンに対するナトリウムイオンのモル比を算出することで確認することができる。
- [0048] また、本発明の人工生理的塩類溶液は、酸化還元電位(ORP)が-800～+200 mVの範囲内であるのが好ましく、-500～+100mVの範囲内であるのがより好ましく、-400～+50mVの範囲内であるのが特に好ましい。酸化還元電位が-800mV未満または+200mVを越えると、適用する器官、組織または細胞の機能が低下してしまう傾向にあるためである。
- [0049] なお、本発明の人工生理的塩類溶液における酸化還元電位は、酸化還元電位計(RM-20P、東亜電波工業社製)を用いて測定された値を指す。
- [0050] 本発明の人工生理的塩類溶液は、広範な範囲への応用が可能であるが、特に、(a

) 器官洗浄液、(b) 人工輸液、人工羊水または保護液、(c) 細胞・組織培養液の用途に供するのが好ましい。なお、これらは本発明の人工生理的塩類溶液を特に好適に適用することができる用途を例示したものに過ぎず、本発明の人工生理的塩類溶液はこれらの用途に限定されず、広範な用途に供することができる。

[0051] (a) 器官洗浄液としての用途

器官洗浄液の用途としては、たとえば、目の洗浄液(点眼剤を含む)や鼻腔の洗浄液、その他、皮膚、耳、心臓、肺、腎臓、肝臓、筋肉、脾臓、脳、口腔、腹腔、脾臓、胆嚢、虫垂、消化管などの器官の洗浄への適用が挙げられる。

[0052] (a-1) 目の洗浄液(点眼剤を含む)としての用途

目の炎症には、局所で起こる炎症部位での活性酸素の発生とさらに局所に炎症性細胞を引き寄せ、その引き寄せられた細胞からの発生する活性酸素の発生があり、その両者により目のかゆみ、眼精疲労などの症状につながり目の組織にダメージを与える。これらの活性酸素の害を阻止するには、活性酸素を消去する能力と炎症性細胞を炎症部位へ引き寄せにくくする能力が必要である。本発明の人工生理的塩類溶液を目の洗浄液として用いることで、活性酸素消去能、炎症性細胞である多形核白血球、特に好中球の走化活性、遊走活性を抑制する作用を示すため、目の洗浄、眼病予防(水泳の後、埃や汗などが目に入ったとき、コンタクト使用、VDT作業中など)、または目の治療時や手術時に洗浄液として使用した場合、電解還元水の抗炎症効果により、炎症が抑制され、目の組織が活性酸素やそれを引き起こす物質によるダメージを受けにくくなる。それにより目の乾き・異物感、目の疲れ、目のかゆみ、まばたきの増加、充血などの症状を緩和することができる。したがって、本発明の人工生理的塩類溶液は、ドライアイ、コンタクトレンズ使用、VDT作業などによる目の乾き・異物感、目の疲れ、目のかゆみ、瞬きの増加、充血などの時に発生する活性酸素による目の組織のダメージを防ぐための、目の洗浄、眼病予防(水泳の後、埃や汗などが目に入ったときなど)、または目の治療時や手術時に使用される目の洗浄液(点眼剤を含む)として特に好適に使用することができる。ドライアイの最近の臨床研究では、VDT作業者の31.2%がドライアイで、44%がドライアイの疑いがある。近年、VDT作業者数は増加の一途をたどっており、非常に多くの人々がドライアイまたはそれ

に近い症状で悩んでいるのが実態である。本発明の人工生理的塩類溶液はライン化によって製造することが可能であり、再現性よく多量に生産することが可能であるため、ドライアイまたはそれに近い症状で悩んでいる人々に広く提供することが可能である。

[0053] 本発明の人工生理的塩類溶液を目の洗浄液として使用する場合には、たとえば、目の周りにフィットする形状のふちを備える5〜20mLのカップに収容し、カップのふちを目に当てて目に人工生理的塩類溶液を接触させながら瞬きをすることで、目の洗浄を行なうことができる。また本発明の人工生理的塩類溶液は点眼剤の形態でも使用することができ、この場合は、通常使用される点眼剤用の容器内に収容し、数滴目に滴下するようにする。点眼剤とする場合、通常点眼剤に配合されるものである防腐剤を配合せずに、使い切りタイプの包装とすることが好ましい。

[0054] (a-2) 鼻腔の洗浄液としての用途

また、本発明の人工生理的塩類溶液を鼻腔の洗浄液として適用した場合には、鼻腔内の埃や雑菌、花粉などを取り除き、鼻腔内の洗浄を好適に行なうことができ、また、人工生理的塩類溶液が有する抗酸化作用、抗炎症作用によって、不所望な副作用が起こることなく花粉症などのアレルギー症状を抑制できる。鼻腔の洗浄液として用いる場合には、たとえば本発明の人工生理的塩類溶液を、噴霧手段を備える容器内に収容し、適宜鼻腔内に噴霧し得るスプレーの形態とすることで、好適に鼻腔の洗浄を行なうことができる。

[0055] (b) 人工輸液、人工羊水または保護液としての用途

本発明の人工生理的塩類溶液を人工輸液、人工羊水または保護液（たとえば心筋保護液）として用いた場合には、細胞や組織、器官、胎児が酸化ダメージを受けにくくなり、結果として回復が早くなるという効果を発揮することができる。本発明の人工生理的塩類溶液を人工輸液として用いる場合、たとえば、人工生理的塩類溶液を公知の輸液バッグ内に収容した形態にて供することができる。また、輸液投与量を少なくし浮腫を防ぐために、上述した本発明の範囲内の高い浸透圧を有する濃縮液（たとえば通常の人工生理的塩類溶液の8倍）の濃度を有する）として人工輸液を実現するようにしてもよい。人工羊水として用いる場合には、出産の現場において早産破水

や羊水過少症の妊婦に、たとえばカテーテルなどを用いて本発明の人工生理的塩類溶液を経腔的に子宮内に注入し得るよう、適宜の容器に收容された形態にて供することができる。また、本発明の人工生理的塩類溶液を保護液(たとえば心筋保護液)として用いる場合には、たとえば、人工生理的塩類溶液を公知の輸液バッグ内に收容した形態にて供することができる。

[0056] (c)細胞・組織培養液としての用途

本発明の人工生理的塩類溶液を細胞・組織培養液として用いた場合には、細胞や組織が酸化ダメージを受けにくくなるという効果を奏する。これによって、より体内に近い環境での培養細胞、培養組織を用いた実験系の実現が可能となる。本発明の人工生理的塩類溶液にて培養し得る細胞としては、初代培養細胞(セルライン化する前の培養細胞)、継代培養細胞、ES細胞など、公知の様々な培養細胞を挙げることができる。中でも、本発明の人工生理的塩類溶液を初代培養細胞の培養に用いると、酸化ダメージの抑制により初代培養細胞の寿命が延びるというような格別の効果を発揮する。本発明の人工生理的塩類溶液を細胞・組織培養液として用いる場合には、たとえば予め濃縮されて容器内に收容された形態で供され、用事、適宜の培地溶液と細胞・組織培養に適した所望の割合で混合して用いることができる。

[0057] 本発明の人工生理的塩類溶液は、本発明の効果を阻害しない範囲で、種々のタンパク質を含有していてもよい。かかるタンパク質としては、たとえば、インスリン、トランスフェリン、スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)、チオレドキシン、グルタチオンペルオキシダーゼ、尿中トリプシンインヒビター(UTI)、アルブミン、アクチビンなどが例示される。本発明の人工生理的塩類溶液中において、上記タンパク質の含有量は6.0質量%以下であるのが好ましい。タンパク質の含有量が6.0質量%を越えると、適用する器官または細胞に不所望な障害、機能低下が発生する虞があるためである。

[0058] 本発明はまた、上述した本発明の人工生理的塩類溶液を製造する方法も提供する。本発明の人工生理的塩類溶液の製造方法は、電解還元水を、活性水素反応値が0.01〜1、pHが4.0〜7.9(好ましくは、6.0〜7.9)、浸透圧が260〜2560mOsm/L(好ましくは、260〜320mOsm/L)となるように調整する方法である。

- [0059] 本発明の製造方法においては、まず、たとえば電解還元水製造装置 (TI-8000、日本トリム社製) を用いて電解還元水を得る。電解還元水は、たとえば、原水 (電気分解する前の水) に適宜の電解質を添加した後、電気分解を行なうことで、得ることができる。電解還元水の作製に用いる原水としては、超純水 (MilliQ 水)、純水、蒸留水、水道水などが挙げられるが、人体や生体細胞への適用を考慮すると、超純水、純水または蒸留水を原水として用いるのが好ましい。
- [0060] 電解質としては、たとえば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、ヘキサクロロ白金酸などが挙げられ、中でも、陽極から発生する次亜塩素酸の混入を避け、また次亜塩素酸を発生させないために、水酸化ナトリウムおよび／または水酸化カリウムが好ましい。電解質は、原水の電気伝導率が好ましくは $100\ \mu\text{S}/\text{cm}$ 以上、より好ましくは $100\text{--}1000\ \mu\text{S}/\text{cm}$ となるよう、原水に添加する。かかる原水の電気伝導率とするための電解質の添加量は、たとえば電解質として水酸化ナトリウムを用いる場合には、 $4\text{--}800\text{mg}/\text{L}$ が例示され、好ましくは $10\text{--}300\text{mg}/\text{L}$ 、より好ましくは $50\text{--}200\text{mg}/\text{L}$ である。
- [0061] 電気分解は、隔膜を隔てて互いに分離された、陰極を含む陰極室および陽極を含む陽極室とを有する電解槽を少なくとも備える公知の電解還元水製造装置 (好適には、TI-8000 (日本トリム社製)) を用いて行なうことができる。電気分解の条件は、特に制限はなく、従来公知の適宜の条件にしたがって行なうことができる。たとえば、電流が $1\text{--}5\text{A}$ 、電圧が $0\text{--}80\text{V}$ 、温度が $4\text{--}60^\circ\text{C}$ 、時間が $1\text{秒--}1\text{時間}$ 、流速が $0\text{--}1500\text{mL}/\text{min}$ である条件が例示される。このような電気分解を終えた後、陰極室に生成された水を、電解還元水として供することができる。さらに電解還元水を RO (逆浸透膜) 処理してから供することがより好ましい。
- [0062] 本発明の人工生理的塩類溶液の製造方法では、このようにして得られた電解還元水を、それぞれ上記範囲の活性水素反応値、pH、浸透圧となるように調整する。活性水素反応値はたとえば、所望の活性水素反応値となるように電解還元水を希釈あるいは濃縮することによって調整することができる。また、pH は、緩衝剤 (たとえば、炭酸水素ナトリウム、リン酸水素ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム、クエン酸、クエン酸ナトリウム、HEPES など) の添加、あるいは塩酸または水酸化ナトリウムの添加によ

って調整することができる。また、浸透圧は、たとえば所望の浸透圧となるように電解還元水を希釈あるいは濃縮することによって調整することができる。これらの手法を、相互の影響を考慮しながら適宜組み合わせて、最終的に0.01～1の活性水素反応値、4.0～7.9(好ましくは、6.0～7.9)のpH、260～2560mOsm/L(好ましくは、260～320mOsm/L)の浸透圧となるように、調整を行なう。

[0063] 本発明の人工生理的塩類溶液の製造方法においては、塩化ナトリウムおよび／または塩化カリウムを添加することによって、電解還元水のイオンバランスを調整する工程をさらに含むことが好ましい。具体的には、塩化ナトリウムおよび／または塩化カリウムを添加することによって、電解還元水においてカリウムイオン：ナトリウムイオン＝1：4～1：8(モル比)となるように、ナトリウムイオンとカリウムイオンとの含量を調整する。ここで、ナトリウム、カリウムについてともに塩化物塩を用いるのは、pHに影響を与えないからである。

[0064] かかるイオンバランスの調整の工程は、上述した活性水素反応値、pHおよび浸透圧を調整する前に行なっても後に行なってもよいが、浸透圧を調整する際にも用いるイオンであるため、活性水素反応値、pHおよび浸透圧を調整する前に行なうのが好ましい。

[0065] 本発明の人工生理的塩類溶液の製造方法における全ての工程は、無菌状態で行なうか、あるいは、人工生理的塩類溶液の作製後、フィルタの滅菌あるいはオートクレーブを用いた滅菌を行なうことが好ましい。

[0066] なお、本発明の人工生理的塩類溶液は、上述したように活性水素反応値が0.01～1、pHが4.0～7.9(好ましくは、6.0～7.9)、浸透圧が260～2560mOsm/L(好ましくは、260～320mOsm/L)であるならば、上述した本発明の製造方法によって製造されたものに制限されるものではない。たとえば、水に白金コロイド、パラジウムコロイド、バナジウムコロイド、鉄コロイド、珪酸コロイドからなる群より選ばれる水素吸着・吸着金属コロイドを添加した後、水素ガスバブリング、ミネラル溶解、超音波処理、磁化処理、物理的生得、マイクロ波原子振動、光照射などの方法によって溶存水素を発生させた後、活性水素反応値、pH、浸透圧を適宜調整する方法や、リチウムやナトリウム、マグネシウムを酸性の水に溶解させた後に、活性水素反応値、pH

、浸透圧を適宜調整する方法によっても、本発明の人工生理的塩類溶液を製造することができる。しかしながら、本発明の人工生理的塩類溶液は、上述した本発明の製造方法によって製造されたものであるのが好ましい。

[0067] 以下、実施例を挙げて本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

[0068] <実施例1>

0.857mM NaOH水溶液と0.143mM KOH水溶液の混合液(0.428mLの2N NaOH水溶液とKOH水溶液の混合液(0.428mLの2N NaOH水溶液と0.072mLの2N KOHを1リットルMiliQ水に溶かす。))を電解還元水製造装置(TI-8000、日本トリム社製)で電気分解した(電流:5A、温度:20°C、流速:1100mL/min)。生成された電解還元水に、浸透圧を調整するために1.437M NaCl-238mM KCl水溶液を添加した(混合割合はNaCl-KCl水溶液:電解還元水=1:9)。それから1N HClと0.1N HClでpHを7.5まで調製した。

[0069] 結果、活性水素反応値0.06(DBNBS法により測定)、pH7.5(pHメータ(φ260、ベックマン社製)を用いて測定)、浸透圧303mOsm/L(浸透圧計(オスモメータ、ROEBLING社製)を用いて測定)の人工生理的塩類溶液が得られた。かかる人工生理的塩類溶液は、ナトリウムイオンを145mEq/L、カリウムイオンを24mEq/L、塩化物イオンを170mEq/L含有し(それぞれICP-MS(Agilent7500、Agilent Technologies社製)を用いて測定)、酸化還元電位は-100mV(酸化還元電位計(RM-20P、東亜電波工業社製)を用いて測定)であった。

[0070] <比較例1>

電解還元水に換えて蒸留水を用いた以外は、実施例1と同様にして、人工生理的塩類溶液を調製した。得られた人工生理的塩類溶液について実施例1と同様に測定したところ、活性水素反応値0、pH7.5、浸透圧303mOsm/Lであった。また、実施例1と同様に測定されたナトリウムイオンの含量は145mEq/L、カリウムイオンの含量は24mEq/L、塩化物イオンの含量は170mEq/L、酸化還元電位は+350mVであった。

[0071] <比較例2>

実施例1で調製した電解還元水を5倍濃縮して用いた以外は、実施例1と同様にして、人工生理的塩類溶液を調製した。得られた人工生理的塩類溶液について実施例1と同様に測定したところ、活性水素反応値1.8、pH7.6、浸透圧303mOsm/Lであった。また、実施例1と同様に測定されたナトリウムイオンの含量は145mEq/L、カリウムイオンの含量は24mEq/L、塩化物イオンの含量は180mEq/L、酸化還元電位は-150mVであった。

[0072] <比較例3>

実施例1で調製した電解還元水に1N HClを添加してpHを5.5に調製した以外は、実施例1と同様にして、人工生理的塩類溶液を調製した。得られた人工生理的塩類溶液について実施例1と同様に測定したところ、活性水素反応値0.06、pH5.5、浸透圧303mOsm/Lであった。また、実施例1と同様に測定されたナトリウムイオンの含量は145mEq/L、カリウムイオンの含量は24mEq/L、塩化物イオンの含量は200mEq/L、酸化還元電位は-50mVであった。

[0073] <比較例4>

実施例1で調製した電解還元水に1N HClを添加してpHを8.5に調製した以外は、実施例1と同様にして、人工生理的塩類溶液を調製した。得られた人工生理的塩類溶液について実施例1と同様に測定したところ、活性水素反応値0.06、pH8.5、浸透圧304mOsm/Lであった。また、実施例1と同様に測定されたナトリウムイオンの含量は145mEq/L、カリウムイオンの含量は24mEq/L、塩化物イオンの含量は180mEq/L、酸化還元電位は-100mVであった。

[0074] <比較例5>

浸透圧の調整の際、1.437M NaCl-238mM KCl水溶液を電解還元水と混合させた(混合割合はNaCl-KCl水溶液:電解還元水=0.8:9.2)以外は、実施例1と同様にして、人工生理的塩類溶液を調製した。得られた人工生理的塩類溶液について実施例1と同様に測定したところ、活性水素反応値0.06、pH7.5、浸透圧240mOsm/Lであった。また、実施例1と同様に測定されたナトリウムイオンの含量は115mEq/L、カリウムイオンの含量は19mEq/L、塩化物イオンの含量は135mEq/L、酸化還元電位は-50mVであった。

[0075] <比較例6>

浸透圧の調整の際、1. 437M NaCl-238mM KCl水溶液を電解還元水と混合させた(混合割合はNaCl-KCl水溶液:電解還元水=1. 2:8. 8)以外は、実施例1と同様にして、人工生理的塩類溶液を調製した。得られた人工生理的塩類溶液について実施例1と同様に測定したところ、活性水素反応値0. 06、pH7. 5、浸透圧360 mOsm/Lであった。また、実施例1と同様に測定されたナトリウムイオンの含量は175mEq/L、カリウムイオンの含量は30mEq/L、塩化物イオンの含量は205mEq/L、酸化還元電位は-50mVであった。

[0076] <評価試験1>

活性酸素消去能の評価試験

実施例1、比較例1〜6の人工生理的塩類溶液について、過酸化水素法を用いて過酸化水素に由来するルミノール発光によって、活性酸素測定値(cpm)を算出した。結果を表1に示す。

[0077] [表1]

	実施例1	比較例1	比較例2	比較例3	比較例4	比較例5	比較例6
活性酸素反応値	0.06	0	1.8	0.06	0.06	0.06	0.06
pH	7.5	7.5	7.6	5.5	8.5	7.5	7.5
浸透圧(mOsm/L)	303	303	303	303	304	240	360
Na ⁺ (mEq/L)	145	145	145	145	145	115	175
K ⁺ (mEq/L)	24	24	24	24	24	19	20
Cl ⁻ (mEq/L)	170	170	180	200	180	135	205
酸化還元電位(mV)	-100	+350	-150	-50	-100	-50	-50
評価試験1 (活性酸素測定値(cpm))	597979 ±34903	1917063 ±59565	683433 ±22323	614453 ±32239	625025 ±89892	619432 ±23898	634282 ±45292
評価試験2 (遊走細胞数(IL-8が100ng/mlの時)	95±21	180±23	135±15	-	-	-	-
評価試験2(生存率(%))	98	98	97	60	49	47	39
評価試験3(目の洗浄液の使用感)	良	良/可	良/可	不可	不可	不可	不可
評価試験4(TBARS(nmol/ml))	2.7±0.5	4.6±0.5	2.3±0.4	3.1±0.4	-	-	-
評価試験5(24時間培養後の生存率(%))	78	41	80	10	2	0	0

[0078] <評価試験2>

好中球の遊走能・走化能抑制作用の評価試験

図1は、本発明に係る人工生理的塩類溶液がケモカインによるヒト好中球の遊走能・走化能を抑制するかを明らかにすることを目的としてなされた実験の結果である。実験方法としては、炎症性細胞の遊走活性・走化活性を測定できるケモタキシスチャンバ法を用いた。まず、実施例1の人工生理的塩類溶液について、ヒト血液より分離された好中球をその液中に浮遊させ一定時間処理する。ケモカイン(IL-8、RANTESなど)の溶液をチャンバのウェルに入れ、その上に膜を載せた。当該膜には好中球の大きさよりわずかに小さい穴が規則的に設けられている。チャンバを組み立てた後、その膜上のウェルに好中球の浮遊液を添加し、一定時間遊走・走化させる。その後、膜の穴を通して遊走・走化してきた細胞を特殊な染色液(Diff-Quick)で染色しカウントした。得られた遊走細胞数(IL-8が100ng/mlの場合)を表1に示す。

[0079] 図1および表1から明らかなように実施例1の本発明の人工生理的塩類溶液で処理した好中球の遊走・走化した細胞数は、コントロール(蒸留水で作成した洗浄水)に比べおよそ半分であり、本発明の人工生理的塩類溶液は好中球の遊走・走化活性を抑制することがわかる。また、比較例1〜6についても上記と同様の実験を行なった結果、比較例1ではコントロールと同じで抑制活性が認められなかった。比較例2においては抑制活性はあったものの、実施例に比較して約半分であった。比較例3〜6においては細胞の生存率が半分以下となり測定不能であった。

[0080] また上記試験と同時に、生細胞測定法により、人工生理的塩類溶液の好中球への影響も確認した。生細胞測定法は、具体的には、トリパネブルーテストを用いた。生細胞はトリパネブルー(青色色素)を細胞外へ排除するため細胞が染色されないが、死細胞は排除できず細胞が染色される。トリパネブルーテストは、位相差顕微鏡で染色された細胞数と染色されなかった細胞数を計測し、生存率(染色されなかった細胞数÷(染色された細胞数+染色されなかった細胞数)×100)(%)を算出する方法である。結果を表1に示す。表1に示すように、実施例1の本発明の人工生理的塩類溶液により好中球は全く障害を受けていないことが確認された。一方、比較例3〜6の場合には、生存率が半分以下になった。よって、そのような状態の細胞を遊走試験に用いることは適切ではないことが判った。

[0081] <評価試験3>

目の洗浄液として使用した場合の使用感の評価

実施例1の人工生理的塩類溶液を用いて、自分の目で目洗浄を試したところ、これといった不快な刺激もなく、洗浄後、液に埃がきちんととれていた。また、10人の協力者に同様に目洗浄を試して、以下の3段階で評価をしてもらった。

良：目に不快な刺激もなく、目の洗浄を行なえる

可：目の洗浄液を行なえるが目に不快な刺激がある、あるいは目に不快な刺激はないが目の洗浄が行なえていない

不可：目に不快な刺激があり、目の洗浄も行なえていない

[0082] 結果を表1に示す。表1に示すように、いずれの人からも目に不快な刺激がなく、目の洗浄を行なうことができた旨の評価が得られた。このことにより、本発明の人工生理的塩類溶液に目の洗浄効果があることがわかる。一方、比較例1、2においては良と可の評価が半々であり、人によりバラツキが認められた。比較例3～6に関しては、全て不可の評価であり、目に不快な刺激があった。

[0083] <評価試験4>

人工輸液としての評価

電解還元水で作製した人工生理的塩類溶液(実施例1)を、FNA(ferric nitrilotriacetic acid;鉄ニトロ三酢酸)を用いて酸化ストレスを与えたラットに輸液として静脈内に継続投与し、酸化ストレスに対する改善効果を評価した。酸化ストレスの指標としてTBARS(thiobarbituric acid-reactive substances;チオバルビツール酸反応)を用いた。これは不飽和脂肪酸の過酸化反応で生成した過酸化脂質の分解反応、糖類の分解反応、核酸塩基の分解反応によって生じるマロンジアルデヒドまたはアルキルアルデヒドをチオバルビツール酸と反応させて生じた赤色の物質を測定するものである。

[0084] まず、6週齢のSD系雄性ラットを4群((1)FNAで0時間処理、(2)FNAで6時間処理・実施例1の人工生理的塩類溶液投与、(3)FNAで6時間処理・比較例1の人工生理的塩類溶液投与、(4)FNAで6時間処理・比較例2の人工生理的塩類溶液投与)に分けて実施した。採血3日前に各ラットの外頸静脈に人工生理的塩類溶液持続投与用カニューレを留置した。カニューレは留置後、閉塞を防ぐため毎日500u

／mlのヘパリン含有生理食塩水で洗浄した。

[0085] FNAは10mg Fe/kgとなるように腹腔内投与した。その直後、シリンジポンプMODEL11(ハーバード社製)を用い実施例1、比較例1および比較例2の人工生理的塩類溶液を、それぞれの群のラットにカニューレを介して0.05ml/minの流速にて1時間持続投与した。FNAの腹腔内投与6時間後、エーテル麻酔下を開腹して腹部大動脈から全採血した。血漿はTBARSの測定まで -80°C に凍結保存した。ラット血漿中のTBARS量は、TBARSアッセイキットOXLtec(ZeptoMetrix社製)を用い、そのプロトコールに従って測定した。結果を表1に示す。

[0086] 結果、FNAで0時間処理した場合のTBARS値が $1.5 \pm 0.3 \text{ nmol/ml}$ であるのが、比較例1ではFNA6時間処理により $4.6 \pm 0.5 \text{ nmol/ml}$ と3.1倍に上昇しているのに対して、実施例1では $2.7 \pm 0.5 \text{ nmol/ml}$ と1.8倍の上昇に留まった。これはFNAによる酸化ストレスを42%軽減したことになる。比較例2では、電解還元水を濃縮した割合ほど効果は大きくなかったが、 $2.3 \pm 0.4 \text{ nmol/ml}$ と1.5倍の上昇に留まった。これはFNAによる酸化ストレスを52%軽減したことになる。なお、比較例4～6については上述した評価試験2で細胞毒性がみられたことから評価試験は行わなかった。

[0087] <評価試験5>

細胞・組織培養液としての効果

ヒト血液より分離された好中球を本発明の人工生理的塩類溶液中で初代培養し、生存率が向上するか否かを評価した。評価は、ヒト血液より分離された好中球を実施例1、比較例1～6の人工生理的塩類溶液中に懸濁し、5ml培養用シャーレに播種し、 37°C 5%炭酸ガスインキュベータにて24時間初代培養し、生存率をトリパンブルーテストにより算出した。結果を表1に示す。

[0088] 培養開始時は、生存率が98%であったのに対し、表1から分かるように、比較例1の24時間培養後の生存率は41%と低下していた。一方、実施例1においては生存率が低下しているものの78%と高値を示した。このことは生存率の悪い初代細胞の培養において、実施例1の人工生理的塩類溶液が生存率の改善に寄与していることを表している。また比較例2においては、電解還元水を濃縮した割合ほど生存率向

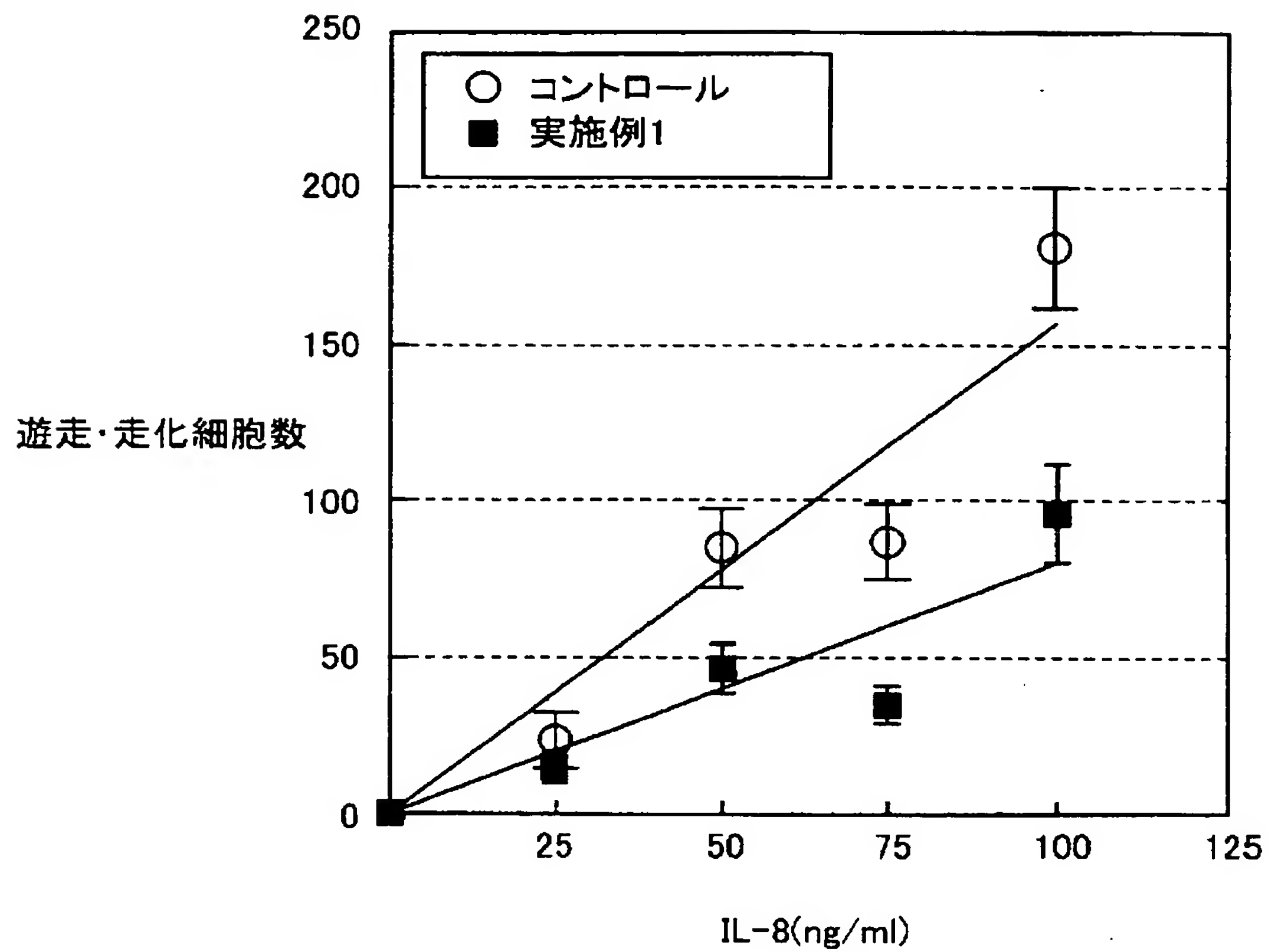
上には寄与しなかったが80%と高い生存率を維持していた。また、その他の生存率に関しては、比較例3が10%、比較例4が2%、比較例5が0%、比較例6が0%であった。

請求の範囲

- [1] 活性水素反応値が0.01～1、pHが4.0～7.9、浸透圧が260～2560mOsm/Lである人工生理的塩類溶液。
- [2] pHが6.0～7.9、浸透圧が260～320mOsm/Lである、請求項1に記載の人工生理的塩類溶液。
- [3] ナトリウムイオン、カリウムイオンおよび塩化物イオンを含むことを特徴とする請求項2に記載の人工生理的塩類溶液。
- [4] ナトリウムイオンを200mEq/L以下含むことを特徴とする請求項3に記載の人工生理的塩類溶液。
- [5] カリウムイオンを100mEq/L以下含むことを特徴とする請求項3に記載の人工生理的塩類溶液。
- [6] 塩化物イオンを200mEq/L以下含むことを特徴とする請求項3に記載の人工生理的塩類溶液。
- [7] 電解還元水にイオンバランスの調整を施したものである、請求項2に記載の人工生理的塩類溶液。
- [8] 酸化還元電位が-800～+200mVであることを特徴とする請求項2に記載の人工生理的塩類溶液。
- [9] 器官洗浄液として用いられる、請求項2に記載の人工生理的塩類溶液。
- [10] 人工輸液、人工羊水または保護液として用いられる、請求項2に記載の人工生理的塩類溶液。
- [11] 細胞・組織培養液として用いられる、請求項2に記載の人工生理的塩類溶液。
- [12] 人工輸液、人工羊水または保護液として用いられる、請求項1に記載の人工生理的塩類溶液。
- [13] 電解還元水を、活性水素反応値が0.01～1、pHが4.0～7.9、浸透圧が260～2560mOsm/Lとなるように調整することを特徴とする人工生理的塩類溶液の製造方法。
- [14] pHが6.0～7.9、浸透圧が260～320mOsm/Lとなるように調整することを特徴とする請求項13に記載の人工生理的塩類溶液の製造方法。

- [15] 塩化ナトリウムおよび／または塩化カリウムを添加することによって、電解還元水のイオンバランスを調整する工程をさらに含むことを特徴とする請求項14に記載の人工生理的塩類溶液の製造方法。

[図1]



(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005 年 9 月 9 日 (09.09.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/082384 A1

- (51) 国際特許分類: A61K 33/14, A61P 7/08, 27/04
(21) 国際出願番号: PCT/JP2005/002778
(22) 国際出願日: 2005 年 2 月 22 日 (22.02.2005)
(25) 国際出願の言語: 日本語
(26) 国際公開の言語: 日本語
(30) 優先権データ:
特願2004-053720 2004 年 2 月 27 日 (27.02.2004) JP
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社日本トリム (NIHON TRIM CO., LTD.) [JP/JP]; 〒5310076 大阪府大阪市北区大淀中 1-8-3 4 Osaka (JP).
(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 樺山 繁

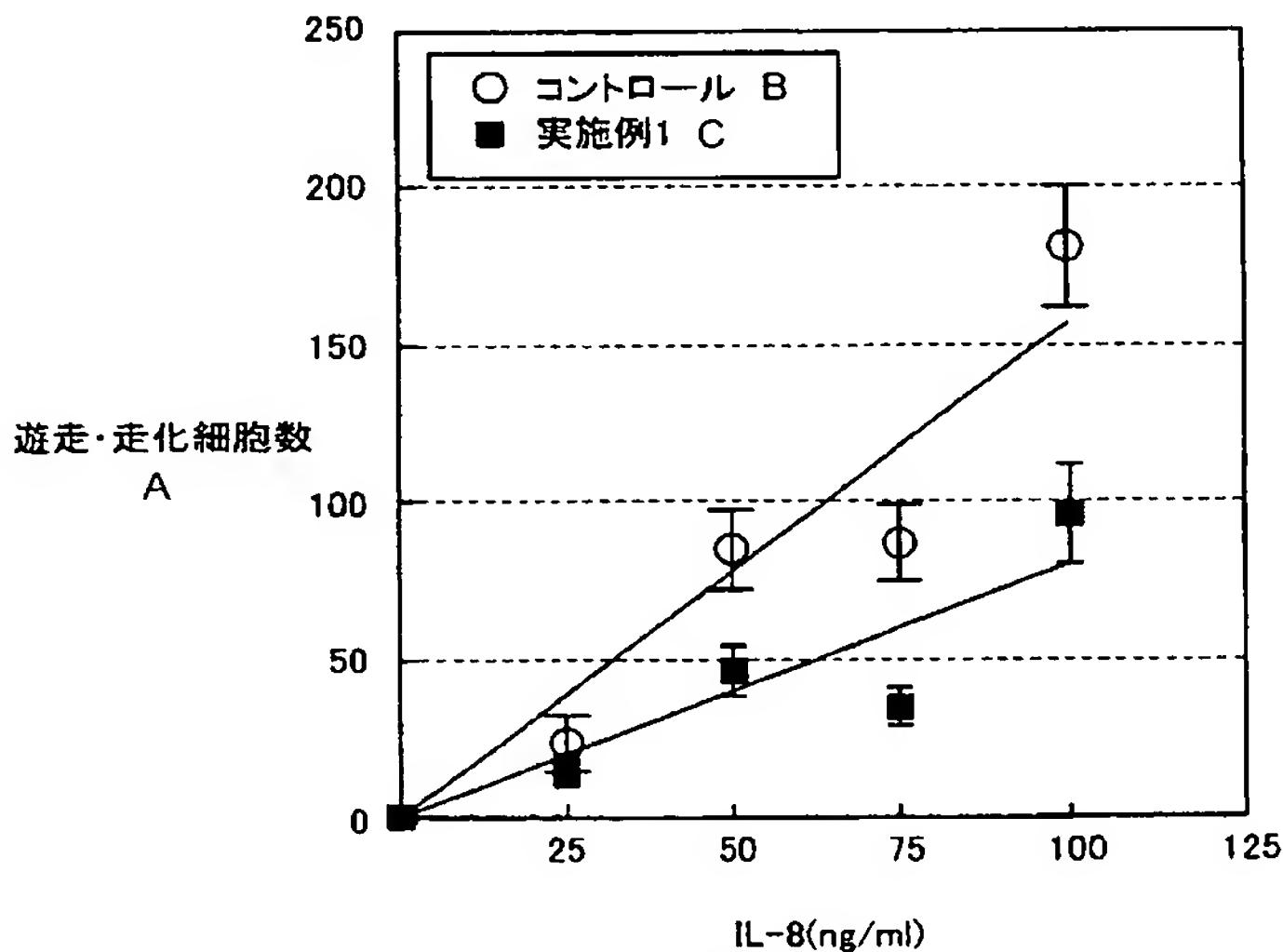
(KABAYAMA, Shigeru) [JP/JP]; 〒5310076 大阪府大阪市北区大淀中 1-8-3 4 株式会社日本トリム内 Osaka (JP). 森澤 紳勝 (MORISAWA, Shinkatsu) [JP/JP]; 〒5310076 大阪府大阪市北区大淀中 1-8-3 4 株式会社日本トリム内 Osaka (JP).

- (74) 代理人: 深見 久郎, 外 (FUKAMI, Hisao et al.); 〒5300054 大阪府大阪市北区南森町 2 丁目 1 番 2 9 号 三井住友銀行南森町ビル 深見特許事務所 Osaka (JP).
(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,

[続葉有]

(54) Title: ARTIFICIAL PHYSIOLOGICAL SALT SOLUTION AND PROCESS FOR PRODUCING THE SAME

(54) 発明の名称: 人工生理的塩類溶液およびその製造方法



A... NO. OF MIGRATORY/CHEMOTACTIC CELLS
B... CONTROL
C... EXAMPLE 1

(57) Abstract: An artificial physiological salt solution of 0.01 to 1 active hydrogen reaction value, 4.0 to 7.9 pH value and 260 to 2560 mOsm/L osmotic pressure; and a process for producing the same. Thus, there can be provided a novel artificial physiological salt solution that has an active oxygen scavenging capability and an antiinflammatory activity, being applicable to a wide variety of uses, such as an organ washing liquid (for example, washing liquids for the eyes and nose), an artificial infusion solution, an artificial amniotic fluid, a protection liquid and a cell/tissue culture solution, and further provided a process for producing the same.

(57) 要約: 活性水素反応値が0.01~1、pHが4.0~7.9、浸透圧が260~2560mOsm/Lである人工生理的塩類溶液、およびその製造方法により、活性酸素消去能および抗炎症作用を有し、器官洗浄液(目の洗浄液、鼻の洗浄液など)、人工輸液、

[続葉有]



SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護
が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ,
BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE,
BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),

添付公開書類:

一 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。